

**Zum Nachweis
humoraler Abwehrkräfte gegen das
Walker - Carcinom der Ratte**

HORST KUHN

1967

AUS DEM
PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

Zum Nachweis
humoraler Abwehrkräfte gegen
das Walker-Carcinom der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
H o r s t K u h n
aus Germering bei München

München 1967

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Professor Dr. Dr. H. Wrba
Correferent:	Professor Dr. W. Büngeler
Dekan:	Professor Dr. F. Holle
Tag der mündlichen Prüfung:	17. X. 1967



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
MATERIAL UND METHODE.....	6
A) Incubationsversuche.....	6
B) Cortisonbehandlung.....	11
C) Milzexstirpation.....	12
VERSUCHSERGEBNISSE.....	12
A) Incubationsversuche zum Nachweis humoraler Abwehrkräfte resistenter Ratten und normaler Ratten gegen das Walker-Ascites-Carcinom.....	12
1) Wirkung von Blutserum verschiedener Herkunft auf die Virulenz von 9×10^7 Zellen des Walker-Ascites-Carcinoms..	12
a) Wirkung des Serums resistenter Ratten, des Serums normaler Ratten und von Kälberserum.....	12
b) Einfluß des Serums resistenter, einmal mit virulentem Tumورascites geimpfter Ratten und des Serums normaler Ratten.....	14
c) Wirkung des Serums resistenter, mehrfach mit Tumорascites geimpfter Ratten und des Serums normaler Ratten.....	16
2) Beeinflussung der Virulenz von 9×10^7 Tumorzellen durch Incubation im Gesamtblut resistenter, mit Tumорascites geimpfter Ratten und im Blutserum normaler Ratten.....	17
3) Wirkung des Serums resistenter, mit Tumорascites geimpfter Ratten, des Serums normaler Ratten und von Kälberserum auf die Virulenz von 3×10^7 Tumorzellen.....	18
4) Einfluß verschiedener Blutsera auf die Virulenz von $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen.....	20
a) Wirkung des Serums resistenter, mit Tumорascites geimpfter Ratten, des Serums normaler Ratten und von Kälberserum.....	20
b) Einfluß des Serums mit virulentem Tumорascites geimpfter, mit denaturiertem Tumорascites geimpfter und nicht geimpfter resistenter Ratten und des Serums ebenso geimpfter normaler Ratten.....	23

5) Wirkung des Peritoneum-Homogenats resistenter, mit Tumoraszites geimpfter Ratten und normaler Ratten auf die Virulenz von $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen.....	26
B) Beeinflussung der Resistenz von Ratten gegen das Walker-Ascites-Carcinom durch Cortisonbehandlung.....	28
C) Beeinflussung der Resistenz von Ratten gegen das Walker-Ascites-Carcinom durch Milzexstirpation.....	28
DISCUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE.....	30
ZUSAMMENFASSUNG.....	45
LITERATURVERZEICHNIS.....	48

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Voraussetzung für das Fortbestehen des lebenden Organismus ist die Widerstandsfähigkeit gegen endogene und exogene Schädlichkeiten. "Das Erstaunen über die Abwehrkraft von Versuchstieren gegen das Wachstum maligner, experimentell gewonnener Zellen gehört zu den stärksten Eindrücken" (DOMAGK(11)). Diese Abwehrkraft läßt sich vor allem in Form einer Immunität oder einer natürlichen Resistenz gegen das progressive Wachstum der transplantierten Tumorzellen veranschaulichen.

Eine Immunität auf dem Boden einer Antigen-Antikörperreaktion erzielt man z.B. durch Injektion vorbehandelter Tumorzellen, von Tumorzellen in subletaler Dosis, zellfreier Tumorextrakte oder durch Ligation und Exstirpation solid gewachsener Tumoren. So erreichte DOMAGK(11) eine Immunität gegen das Ehrlich-Carcinom der Maus durch Injektion von Tumorzellen, die durch destilliertes Wasser, mehrfaches Gefrieren und Auftauen vorbehandelt wurden. Kaninchen konnten durch Transplantation virulenter Zellen des Brown-Pearce Tumors in die Skrotalhaut gegen diesen Tumor geschützt werden (DOMAGK(12), HACKMANN(21)). An anderer Stelle berichten DOMAGK und HACKMANN(10) über eine erfolgreiche Immunisierung gegen das Ehrlich'sche Mäusecarcinom nach Injektion zellfreier Tumorextrakte. In Versuchen von DRUCKREY und Mitarbeitern (13) erwiesen sich Ratten nach Exstirpation subcutan gewachsener Jensen-Sarkome als immun gegen weitere Trans-

plantationen dieses Tumors.

Über eine Übertragung einer Immunität berichtet z.B. LETTRÉ (28). Er konnte das Wachstum eines Ascites-tumors der Maus durch das Serum mit diesem Tumor sensibilisierter Kaninchen hemmen, während das Serum mit normalen Mäusezellen vorbehandelter Kaninchen wirkungslos war. Über ähnliche Ergebnisse (Brown-Pearce Tumor) berichtet HACKMANN (21).

Eine Aussage "Tumorimmunität" verlangt in erster Linie den Ausschluß einer möglichen Transplantationsimmunität (PASTERNAK (34)). Die Abwehrreaktion ist bei einer Transplantationsimmunität weniger gegen spezifische Tumorantigene gerichtet, sondern allgemein gegen Transplantationsantigene des übertragenen Gewebes, die vor allem von den sog. Histokompatibilitätsgenen einzelner, genetisch jeweils differenter Individuen determiniert werden (PASTERNAK (34), GORER und Mitarbeiter (19), SNELL (46, 47, 48)). Deshalb ist beim Nachweis tumorspezifischer Reaktionen im homologen Versuchssystem (Transplantation von Geweben zwischen Individuen gleicher Art aber genetisch unterschiedlicher Konstitution) und im heterologen Versuchssystem (Individuen verschiedener Art) die Gefahr besonders groß, daß eine Tumorimmunität durch eine Transplantationsimmunität vorgetäuscht wird (PASTERNAK (34)).

Unter Berücksichtigung dieser genetischen Grundlagen wurde durch Immunisierungsversuche in den letzten Jahren die Thematik der Antigenität von Tumoren verschiedener

Ätiologie bearbeitet. Man bediente sich vor allem des isologen Testsystems, d.h. Versuchstiere und Tumormaterial entstammen einer genetisch weitgehend identischen Tierart. Außerdem wurden größtenteils die verwendeten Tumoren schon nach relativ wenigen Transplantationspassagen (im Gegensatz zu den oft jahrzehntelang auf Tieren gehaltenen Impftumoren) für die Versuche herangezogen, da nach längeren Passagen Antigenänderungen leicht möglich sind.

So erzielte z.B. an der Maus PRINCE und Mitarbeiter (37) eine Immunität in diesem strengen Sinn gegen ein Mammacarcinom durch Injektion lebender Tumorzellen in subletalen Dosen, HABEL (20) und SJÖGREN (45) durch Injektion röntgenbestrahlter Zellen gegen Polyomavirus-Tumoren, KLEIN und Mitarbeiter (27) gegen Virusleukosen, PASTERNAK und Mitarbeiter (35) gegen Dimethylbenzanthrazen-Sarkome, PREHN (36) durch Exstirpation von Dibenzanthrazen-Sarkomen gegen diese Sarkome.

Vor allem mit Hilfe solcher Versuche konnten in den letzten Jahren exacte Beweise der spezifischen Antigenität verschiedener experimenteller Tumoren erbracht und auch einige Ergebnisse über den Mechanismus der Abwehrreaktion publiziert werden (PASTERNAK (34), RUBNER(40)).

Experimente, das Wachstum isologer Transplantate durch das Serum immuner Tiere zu hemmen, blieben vor allem bei den carcinogeninduzierten Tumoren ohne Erfolg (KLEIN und SJÖGREN (26)).

Der bisher verwendete Begriff Tumorimmunität

ist jedoch nur im relativen Sinn zu gebrauchen. Alle Versuche wurden mit Zellmengen durchgeführt, die nur einen sehr geringen Bruchteil der Gesamtzahl eines Tumors ausmachen. Die Immunität ist vielleicht gerade noch nachweisbar, wenn etwa 10^6 Tumorzellen appliziert werden und sie wird mit höheren Dosen sicher durchbrochen (PASTERNAK (34)).

Streng von Tumormunität und Transplantationsimmunität zu trennen ist die primäre, natürliche Resistenz. Sie stellt eine weitere wesentliche Form der Abwehrkraft von Versuchstieren gegen experimentelle Tumoren dar. Ihr Wesen und Mechanismus sind im Gegensatz zur Tumor- und Transplantationsimmunität aber noch weitgehend ungeklärt.

Transplantiert man Zellen von Impftumoren innerhalb einer Tierart von Passage auf Passage, also auf im Gegensatz zur Versuchsanordnung zum Nachweis der Tumormunität völlig unbehandelte, normale Versuchstiere, so führen diese Zellen nicht bei jedem Tier zur Entwicklung eines Tumors. Stets bleiben Tiere übrig, die sich aus eigenen Kräften mit vollem Erfolg dem Wachstum der malignen Zellen symptomlos zu widersetzen vermögen. Auch eine "übermaximale Beimpfung" (JUNKMANN (24)) führt im Unterschied zu den Reaktionen bei der Tumormunität nicht zu einem 100%igen Impferfolg. Die der Resistenz zugrunde liegende Abwehrkraft ist offensichtlich wesentlich größer als die der Tumormunität. Eine bestimmte Zahl von Tieren erweist sich also als resistent. APOLANT (2) prägte

für sie den Begriff "Nuller". Impft man sie ein zweites Mal mit denselben Tumorzellen, dann führen diese Zellen manchmal noch bei einigen Tieren zum Tumorwachstum. Die meisten Tiere jedoch überstehen diese zweite und eventuelle weitere Impfungen. Der Anteil der resistenten an der Zahl der insgesamt geimpften Tiere ist vor allem abhängig von der Art und dem Alter der Versuchstiere und der Art der transplantierten Tumorzellen (BAUER (3), JUNKMANN (24), WRBA und RABES (53)).

Eine Resistenz gegen einen bestimmten Tumor schließt oft auch eine Resistenz gegen andere Tumoren ein. Durch virulentere Tumoren kann sie jedoch durchbrochen werden (FROHBERG und MATTHIES (16, 17), WRBA, RABES (53)).

Sicher verfügen auch normale Versuchstiere über eine gewisse Abwehrkraft gegen maligne Impfgeschwülste. Dies zeigt u.a. die Tatsache, daß die Impfausbeute nach der Transplantation von Tumorzellen umso geringer ist, je kleiner die Anzahl der verimpften Zellen ist und daß zur erfolgreichen intraperitonealen Übertragung von Impftumoren weit weniger Zellen nötig sind als zur intravenösen (BAUER (3), SCHMÄHL (42)). Diese Abwehrkraft versagt jedoch im Gegensatz zur Resistenz bei Transplantation sehr hoher Zellzahlen.

Zur Klärung des Wesens der erstaunlich großen Abwehrkraft resistenter Ratten sollten Versuche beitragen, durch Parabiose die Resistenz von Ratten gegen das Walker-Carcinom (WRBA und RABES (51), RABES (38), ALBER(1)) und die Resistenz von Mäusen gegen Leukämietumoren (FURTH

und Mitarbeiter (18)) auf artgleiche Tiere zu übertragen. Die Existenz humoraler Abwehrfaktoren sollte dadurch nachgewiesen werden. Jedoch blieben diese Versuche ohne Erfolg. Eine funktionierende Anastomose der Gefäßsysteme beider Parabiosepartner konnte bei Ratten aber nachgewiesen werden (WRBA und RABES (52)).

Die Existenz humoraler Abwehrfaktoren resistenter Ratten galt deshalb als unwahrscheinlich. Bei Berichten über die erfolgreiche Übertragung von Abwehrkräften (HARRIS (22), BICHEL und HOLM-JENSEN (4)) handelt es sich nicht um die Übertragung einer Tumorresistenz, sondern um die Übertragung einer Tumormunität oder einer Transplantationsimmunität.

Der Zweck unserer Arbeit sollte es nun vor allem sein, zum Problem des Nachweises humoraler Abwehrkräfte gegen das Walker-Ascites-Carcinom resistenter Ratten und normaler Ratten einen Beitrag zu liefern. Außerdem untersuchten wir die Möglichkeit der Existenz organspezifischer, lokaler Abwehrkräfte des Peritoneums resistenter und normaler Ratten und den Einfluß einer Cortisonbehandlung und der Milzexstirpation auf die Resistenz.

MATERIAL UND METHODE

A: INCUBATIONSVERSUCHE

Die Versuche bestanden in einer Kombination von *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen. Für 24 Stunden wurde eine bestimmte Zahl von Zellen des Walker-Ascites-Carci-

noms im Serum gegen dieses Carcinom resistenter Ratten incubiert. Um die Wirkung der Incubation auf die Virulenz der Tumorzellen feststellen zu können, wurden die Tumorzellen nach der Incubation zu gleichen Teilen auf normale Ratten verimpft.

Als Kontrolle diente jeweils die Incubation der gleichen Anzahl von Walker-Ascites-Carcinomzellen im Blutserum normaler Ratten mit entsprechender Transplantation und die Verimpfung der nativen Tumorzellen. Um feststellen zu können, ob auch normale Ratten eine humorale Abwehrkraft gegen das Walker-Ascites-Carcinom besitzen, wurden im gleichen Versuchsansatz die Walker-Ascites-Carcinomzellen in Kälberserum incubiert. Es ist dafür geeignet, da es als Mediumzusatz für die Züchtung von Walker-Carcinomzellen in vitro brauchbar ist.

Als Maßstab für die Wirkung der Incubation auf die Virulenz der Tumorzellen diente die Tumorräte (Impfausbeute, Tumorausbeute), d.h. die Anzahl der Tiere, die nach Verimpfung der incubierten Tumorzellen während einer Versuchsreihe mit einem Tumoraszites starben. Um diese möglichst genau zu erfassen, wurde zur Errechnung der Tumorräte in Prozenten die Zahl der insgesamt geimpften Ratten zugrunde gelegt abzüglich der Tiere, die sich als resistent erwiesen oder aus anderer Ursache starben. Infizierte Ansätze führten innerhalb von zwei Tagen zum Tode der geimpften Ratten und wurden nicht verwertet.

Die incubierten Zellen einer Probe wurden jeweils zu gleichen Teilen auf drei Ratten intraperitoneal

überimpft. Die Ratten, bei welchen Tumorwachstum ausblieb, wurden noch zweimal im Abstand von vier Wochen mit 0,5 ml unbehandeltem Walker-Ascites-Carcinom beimpft und dann im Falle des Überlebens als primär resistent betrachtet.

Die Menge des Serums betrug für jede Incubation in allen Versuchen 3 ml. Hinsichtlich der Anzahl der verwendeten Tumorzellen herrschten für jede Versuchsreihe die gleichen quantitativen Bedingungen. Die Tumorzellen für einen Versuch wurden stets nur einem tumortragenden Tier entnommen. Sämtliche für einen Versuch verwendete Ratten waren gleichen Geschlechts. Die Versuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden 280-350 g schwere Ratten des Sprague-Dawley-Stammes, einer Koloniezucht in Bruder-Schwester-Kreuzung verwendet. Nach Möglichkeit wurden im gleichen Versuch Wurfgeschwister genommen.

Als Tumormaterial diente das als hämorrhagischer Ascites wachsende Walker-Carcinom. Es wurde vor sieben Jahren durch intraperitoneale Injektion einer Zellsuspension des soliden Walker-Carcinoms gewonnen (WRBA und RA-BES (51)) und wird seither am Institut durch Verimpfung von jeweils 0,5 ml Tumorascites auf Ratten gehalten.

An allen verwendeten resistenten Ratten wurde die Resistenz durch drei überstandene intraperitoneale Tumortransplantationen, die im Abstand von mindestens vier Wochen erfolgten, bestätigt. Bei parallel dazu geimpften Kontroll-Tieren führten die Transplantationen mit demselben Tumor stets zum Tumorwachstum. Bei den meisten

resistenten Ratten bestand die erste überstandene Transplantation in einer Verimpfung von Walker-Carcinomzellen. Auch die bei unseren Versuchen entstandenen resistenten Tiere wurden verwendet mit Ausnahme derer, die Walker-Carcinomzellen erhalten hatten, die im Serum resistenter Ratten incubiert worden waren. Einige der resistenten Tiere hatten Transplantationen verschiedener Impftumoren überstanden. Einheitlich bei allen resistenten Tieren bestand jedoch die zweite und dritte überstandene Transplantation in einer intraperitonealen Verimpfung von je 0,5 ml des Walker-Ascites-Carcinoms. Die resistenten Tiere wurden frühestens vier Wochen nach der letzten Transplantation verwendet.

Um eine vermehrte Produktion von Abwehrfaktoren bei resistenten und normalen Ratten auszulösen, wurden bei bestimmten Versuchen die Tiere vier Tage vor der Entblutung intraperitoneal mit 1,0 ml virulentem oder hitzedenaturiertem Tumorasites geimpft. Für die resistenten Ratten bedeutete diese Impfung also die vierte Transplantation. Diese Tiere werden im folgenden als "geimpfte resistente Ratten" bezeichnet. Die Denaturierung erfolgte durch 20 Min. langes Erhitzen des Tumorasites in einem Wasserbad von 56° C.

Parallel zu jeder Transplantation wurden als Kontrollen je drei normale Ratten mit demselben Tumorasites geimpft.

Die Gewinnung des Tumorasites erfolgte durch sterile Punktion der Bauchhöhle der getöteten Ratte vier

bis fünf Tage nach Verimpfung des Tumors. Nach einer Verdünnung von 1:20 mit destilliertem Wasser in einer Leukozytenpipette wurde die Konzentration der Tumorzellen in der Thoma'schen Zählkammer bei 250-facher Vergrößerung bestimmt. Die Konzentration schwankte in der Zeit der Versuche zwischen 35000 und 95000 Tumorzellen pro mm^3 Tumoraszites bei einem Durchschnittswert von etwa 60000 Zellen.

Es wurden 9×10^7 , 3×10^7 und $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen incubiert. Zur Ermittlung von 9×10^7 und 3×10^7 Zellen wurden 2 ml Tumoraszites in 5 ml Hanks-Salzlösung, zur Ermittlung von $1,5 \times 10^6$ Zellen 0,5 ml Tumoraszites in 4,5 ml Hanks-Salzlösung sofort nach der Punktion aufgenommen. Dadurch wurde die Gerinnung des Tumoraszites verhindert. Geringe Verklumpungen waren durch mehrmaliges Aufziehen in einer Pipette zu beseitigen. Aus der gegebenen Verdünnung des Tumoraszites mit Hanks-Salzlösung sowie aus der ermittelten Zellkonzentration wurde die Menge des verdünnten Tumoraszites errechnet, die die gewünschte Anzahl von Walker-Carcinomzellen enthielt und mit entsprechend geeichten Pipetten entnommen. Anschließend wurden die Tumorzellen noch zweimal in Hanks-Salzlösung gewaschen, wobei nach etwa eine Minute langem Zentrifugieren bei 1000 U/Min. der Überstand, bestehend aus Ascitesserum und Hanks-Salzlösung, verworfen wurde. Vor Zugabe des Blutserums lag also praktisch nur die gewünschte Anzahl von Tumorzellen vermischt mit einigen Erythrozyten und Leukozyten vor.

Zur Gewinnung des Blutserums der resistenten und normalen Ratten wurde in Äthernarkose nach Joddeseinfektion

des Fells und anschließender Eröffnung des Thorax der linke Ventrikel des Herzens eröffnet. Das Blut wurde nach Gerinnung 10 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Je 3 ml Serum wurden abpipettiert und den Tumorzellen zugesetzt.

Die Gerinnung des für einige Orientierungsversuche benötigten Blutes wurde durch Zusatz von zwei Tropfen Liquemin (aus 5 ml Ampullen mit 25000 I.E. Heparin) auf etwa 10 ml Blut verhindert.

Das Peritoneum wurde mit Hilfe anatomischer Pinzetten aus dem Mesenterium von Darm, Milz und Magen der entbluteten resistenten und normalen Ratten gewonnen. Etwa 0,04 g wurden in 3 ml Hanks-Salzlösung aufgenommen und im Dispersionsgerät etwa 2 Min. bei Eiskühlung homogenisiert. Diesem Homogenat wurden anschließend noch etwa 10000 I.E. Penicillin und die jeweilige Anzahl von Tumorzellen hinzugefügt. Im weiteren Verlauf wurde wie mit den in Blutserum incubierten Tumorzellen verfahren.

Zur Incubation erwies sich eine Roller-Apparatur als am besten geeignet. Es handelt sich dabei um einen Brutschrank, in dem zwei durchbohrte Metallscheiben mit einer Geschwindigkeit von etwa 45 U/Min. rotieren. Die Reagenzgläser rotierten in dieser Trommel, wodurch eine intensive Durchmischung erreicht wurde. Es wurde 24 Stunden bei $38,5^{\circ}\text{C}$ incubiert.

Die morphologische Kontrolle wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop im Thermostaten bei $38,5^{\circ}\text{C}$ vor und nach der Incubation vorgenommen.

B: CORTISONBEHANDLUNG

Es wurden täglich 6 mg Cortison-"Ciba" intramuskulär abwechselnd in die Oberschenkel der Hinterbeine injiziert.

C: MILZEXSTIRPATION

Die Milzexstirpation erfolgte unter sterilen Bedingungen an äthernarkotisierten Ratten. Nach Enthaarung und Joddesinfektion des Operationsfeldes wurde 1 cm unterhalb des linken Rippenbogens durch einen etwa 1 cm langen Schnitt parallel zum Rippenbogen das Abdomen eröffnet. Die Milz wurde durch die Öffnung nach außen gezogen und nach zwei Ligationen dicht am Hilus abgetrennt. Die Bauchdecke wurde darauf in allen Schichten durch fortlaufende Naht verschlossen.

VERSUCHSERGEBNISSE

A: Incubationsversuche zum Nachweis humoraler Abwehrkräfte resistenter Ratten und normaler Ratten gegen das Walker-Ascites-Carcinom.

- 1) Wirkung verschiedener Blutsera auf die Virulenz von 9×10^7 Zellen des Walker-Ascites-Carcinoms
 - a) Wirkung des Serums resistenter Ratten, des Serums normaler Ratten und von Kälberserum

Wir incubierten je 9×10^7 Tumorzellen im Blutserum resistenter Ratten, im Blutserum normaler Ratten und

in Kälberserum. Anschließend überimpften wir die Tumorzellen auf je drei Ratten, so daß also etwa 3×10^7 Zellen auf ein Tier kamen. Diese Anzahl von Tumorzellen ist vergleichsweise bei einer mittleren Zellkonzentration von 60000 Zellen/mm³ in 0,5 ml Tumorascites enthalten.

Das Ergebnis der Versuchsreihe zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1. Virulenz von 9×10^7 Zellen des Walker-Ascites-Carcinoms nach Incubation im Serum resistenter Ratten, normaler Ratten und Kälberserum

	Incubations-Sera						Kontrollen	
	Serum resistenter Ratten		Serum normaler Ratten		Kälberserum			
Impf-Ergebnis	†, mit Tumor-Ascites	resistent	†, mit Tumor-Ascites	resistent	†, mit Tumor-Ascites	resistent	†, mit Tumor-Ascites	resistent
Versuch								
1	3		3		3		3	
2	2		2		2		3	
3	1	1	3		2		2	1
4	3		2		1	1	3	
5	3		2		3		3	
6	3		1	2	3		3	
7	2	1	3		3		3	
8	3		3		3		2	1
9	2		2	1	1		3	
10	2		3		2	1	3	
11	3		2		3		2	
Tumor-rate	27= 87%		26= 86%		26= 84%		30= 97%	
Überlebenszeit (Tage)	13		11		14		7	

Zwischen den Tumorausbeuten, die mit den verschieden incubierten Tumorzellen erzielt wurden, besteht kein wesentlicher Unterschied. Ein Vergleich mit der Tumorrates der nicht incubierten Kontrollzellen zeigt jedoch, daß die Virulenz der incubierten Tumorzellen durch die 24stündige Incubation verringert wurde. Das arithmetische Mittel der Überlebenszeiten liegt bei den mit incubierten Tumorzellen geimpften Ratten durchwegs höher als bei den mit den nicht incubierten Tumorzellen geimpften Kontrolltieren. Die jeweiligen Zahlen der Tiere, die sich als resistent erwiesen, zeigen keine wesentliche Differenz.

- b) Einfluß des Serums resistenter, mit virulentem Tumoras-
cites geimpfter Ratten und des Serums normaler Ratten.

Bei den in der ersten Versuchsserie verwendeten resistenten Ratten lag der Zeitpunkt der letzten überstandenen Transplantation mindestens vier Wochen vor dem Versuchstag. Die Entblutung fand also zu einem Zeitpunkt statt, in dem möglicherweise der vermutete Abwehrstoff schon aus der Blutbahn der Tiere verschwunden war.

In den folgenden Versuchen wurden deshalb zur Aktivierung der Abwehrkraft die resistenten Ratten vier Tage vor der Entblutung mit 1,0 ml virulentem Tumoras-
cites intraperitoneal geimpft.

Auf eine Incubation der Tumorzellen in Kälberserum wurde verzichtet, da die erste Versuchsreihe keinen Unterschied zwischen der Wirkung des Normalserums und

der des Kälberserums gezeigt hatte. Das Ergebnis wird aus Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2. Virulenz von 9×10^7 Walker-Carcinomzellen nach Incubation im Serum resistenter, mit virulentem Tumorasites geimpfter Ratten und normaler Ratten

	Incubations-Sera				Kontrollen	
	Serum resistenter Ratten		Serum normaler Ratten			
Impf-Ergebnis	†, mit Tumor-Ascites	resistent	†, mit Tumor-Ascites	resistent	†, mit Tumor-Ascites	resistent
Versuch						
1	0	2	3	3	3	1
2	3		0		3	
3	1	1	2		3	
4	3		3		2	
5	3		3		2	
6	2		3		3	2
7	2		1		3	
8	3		2		2	
9	2		3		3	
10	3		3		1	
11	1	1	2		3	
12	2		2		3	
13	2		3		3	
Tumor-rate	27= 77%		30= 83%		34= 94%	
Überlebenszeit (Tage)	10		13		8	

Die mit den incubierten Zellen erzielten Tumorausbeuten unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Die übrigen Befunde entsprechen ebenfalls denen der Tabelle 1.

c) Wirkung des Serums resistenter, mehrfach mit Tumoras-
cites geimpfter Ratten und des Serums normaler Ratten.

Da die resistenten Ratten nur in beschränktem
Maß zur Verfügung standen, blieben wir bei diesen Versuchen
im Rahmen von Orientierungsversuchen unter Beibehaltung
der bisherigen Versuchsbedingungen. Wir impften die re-
sistenten Tiere 7 mal im Abstand von zwei Tagen mit je
0,5 ml Tumorasites. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist,
führten auch diese Versuche zu keinem fassbaren Unterschied
zwischen dem Serum normaler und dem resistenter Ratten

Tabelle 3. Virulenz von 9×10^7 Tumorzellen nach Incubation
im Serum resistenter, 7 mal im Abstand von zwei
Tagen mit Tumorasites geimpfter Ratten und nor-
maler Ratten

	Incubations-Sera				Kontrollen
	Serum resistenter Ratten		Serum normaler Ratten		
Impf- Ergebnis	✚, mit Tumor- Ascites	resi- stent	✚, mit Tumor- Ascites	resi- stent	✚, mit resi- Tumor- stent Ascites
Versuch					
1	3		3		3
2	2		3		2
3	3		1		3
4	2		3		1 2
5	3		2	1	3
Tumor- rate	13= 87%		12= 86%		12= 92%
Überle- benszeit (Tage)	10		13		8

- 2) Beeinflussung der Virulenz von 9×10^7 Tumorzellen durch Incubation im Gesamtblut resistenter, mit Tumorascltes geimpfter Ratten und im Blutserum normaler Ratten

Um eine mögliche Wirkung des Gesamtblutes resistenter Ratten auszuschließen, wurden die Tumorzellen in 5 ml Gesamtblut resistenter, vier Tage vorher mit 1,0 ml Tumorascltes geimpfter Ratten und im Blutserum normaler Ratten incubiert. Tabelle 4 zeigt, daß auch das Gesamtblut geimpfter resistenter Ratten keinen hemmenden Einfluß auf das Wachstum von 9×10^7 Walker-Carcinomzellen hat.

Tabelle 4. Virulenz von 9×10^7 Tumorzellen nach Incubation in 5 ml Gesamtblut geimpfter resistenter Ratten und im Blutserum normaler Ratten

	Incubations-Medien				Kontrollen	
	Gesamtblut resistenter Ratten		Blutserum normaler Ratten			
Impf-Ergebnis	†, mit Tumor-Ascites	resi-stent	†, mit Tumor-Ascites	resi-stent	†, mit Tumor-Ascites	resi-stent
Versuch						
1	2	1	3		3	
2	3		2		3	
3	2		2		3	
4	3		3		3	
5	3		3		3	
Tumor-rate	13= 93%		13= 86%		15= 100%	
Überlebenszeit (Tage)	10		13		8	

3) Wirkung des Serums resistenter, mit Tumorascites geimpfter Ratten, des Serums normaler Ratten und von Kälberserum auf die Virulenz von 3×10^7 Tumorzellen

Der Grund dafür, daß sich in unseren bisherigen Versuchen keine Wirksamkeit eines humoralen Abwehrstoffes der resistenten Ratten gezeigt hatte, konnte u.a. daran liegen, daß zum gewählten Zeitpunkt der Gewinnung des Serums dieser Abwehrstoff in einer Konzentration vorlag, die zu gering war, um das Wachstum von 9×10^7 Tumorzellen zu hemmen. Da von den Ratten nicht wesentlich mehr Serum gewonnen werden konnte, wurde also die Anzahl der jeweils incubierten Tumorzellen auf 3×10^7 Zellen verringert. Die übrigen Versuchsbedingungen wurden beibehalten. Die jetzt nach der Incubation auf eine Ratte verimpfte Anzahl von 10^7 Zellen entsprach bei einer mittleren Zellzahl von 60000 Zellen/mm³ etwa 0,17 ml des nativen Tumorascites. Wir hofften trotz der mit der 24stündigen Incubation verbundenen Verringerung der Virulenz der Tumorzellen bei dieser Menge noch eine genügend große Impfausbeute für die im Kälberserum und im Serum normaler Ratten incubierten Tumorzellen zu erreichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Zwischen der Tumorräte der im Serum resistenter Ratten und derjenigen der im Serum normaler Ratten incubierten Zellen zeigt sich ein Unterschied von 26%.

Die Tumorräte der im Serum normaler Ratten incubierten Zellen unterscheidet sich von derjenigen der in

Kälberserum incubierten Zellen nicht auffallend.

Gegenüber den Kontrollen besteht wie bisher eine geringe Differenz. Insgesamt ist die Tumorausbeute nur wenig geringer als bisher. Überlebenszeiten und Anzahl der resistenten Ratten, die überlebten, sind nicht auffallend verändert.

Tabelle 5. Virulenz von je 3×10^7 Tumorzellen nach Incubation im Serum resistenter, mit Tumorasites geimpfter Ratten, normaler Ratten und Kälberserum

	Incubations-Sera						Kontrollen	
	Serum resistenter Ratten		Serum normaler Ratten		Kälberserum			
Impf-Ergebnis	+, mit Tumor-Ascites	resistent	+, mit Tumor-Ascites	resistent	+, mit Tumor-Ascites	resistent	+, mit Tumor-Ascites	resistent
Versuch								
1	1		2	1	2		2	
2	1	2	1		2		3	
3	0		2		1	2	1	1
4	2		2		3		2	
5	3		3		3		3	
6	2		3		2		3	
7	1 ⁺		1	1	2	1	3	
8	3		1		3		2	1
9	2		2		3		3	
10	0	1	2		2 ⁺		3	
11	1		2		3		1	2
12	0	1	2		3		3	
13	1		2	1	2	1	3	
14	2		3		1		3	
15	2		3		2		2	1
16	1		2		1		1	
Tumor-rate	20= 47%		33= 73%		34= 79%		38= 88%	
Überlebenszeit (Tage)	15		10		16		7	

⁺ = 1 Ratte starb ohne Tumorasites an einer intercurrenten Krankheit.

4) Einfluß verschiedener Blutsera auf die Virulenz von
 $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen

- a) Wirkung des Serums resistenter, mit Tumoraszites geimpfter Ratten, des Serums normaler Ratten und von Kälberserum

Wir hatten mit der Verwendung von 3×10^7 Tumorzellen offensichtlich eine kritische Zellzahl gefunden, bei der unter den Bedingungen der Versuchsmethode das Serum der resistenten Ratten eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der Walker-Carcinomzellen auszuüben beginnt. War diese Wirkung tatsächlich abhängig von der Konzentration der Tumorzellen im Incubationsserum, dann war zu erwarten, daß unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen die festgestellte Differenz der Tumorraten durch weitere Verringerung der incubierten Tumorzellen größer würde.

Es ergab sich dabei die Schwierigkeit, eine Anzahl von Tumorzellen für die Incubation zu finden, die einerseits noch eine genügend hohe Impfausbeute bei den Kontrollen liefert, andererseits aber eine deutlichere wachstumshemmende Wirkung des Serums resistenter Ratten zuläßt. Zugleich sollte die Zellzahl aber auch klein genug sein, um die Wirkung einer eventuell doch vorhandenen Abwehrkraft des Serums normaler Ratten gegenüber der Wirkung des Kälberserums sichtbar werden zu lassen.

Nach Orientierungsversuchen, bei denen wir in fallender Konzentration in Kälberserum incubierte Zellen verimpften, stellten wir schließlich fest, daß durch Ver-

impfung von $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen noch eine genügend große Impfausbeute erzielt wird.

Diese Menge wurde in den folgenden Versuchen im Serum resistenter, vier Tage vorher geimpfter Ratten, im Serum normaler Ratten und im Kälberserum incubiert. Sie ist in etwa 0,025 ml nativem Tumorascites enthalten.

Um morphologische Veränderungen der verschiedenen incubierten Tumorzellen erfassen zu können, wurden die Zellen vor und nach der Incubation auf einem Objektträger unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Eine Übersicht der Ergebnisse enthält Tabelle 6.

Das wichtigste Ergebnis ist, daß jetzt zwischen der Tumorraten der im Serum resistenter Ratten und derjenigen der im Normalserum incubierten Zellen ein Unterschied von 64% besteht. Zwischen der Wirkung des Kälberserums und der des Normalserums ergibt sich jedoch auch hier keine auffallende Differenz.

Morphologische Veränderungen der in den verschiedenen Blutsera incubierten Tumorzellen konnten nicht festgestellt werden.

Tabelle 6. Virulenz von $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen nach Incubation
im Serum resistenter, mit Tumorascites geimpfter
Ratten, normaler Ratten und im Kälberserum

	Incubations-Sera						Kontrollen	
	Serum resistenter Ratten		Serum normaler Ratten		Kälber- serum			
Impf- Ergebnis	+, mit Tumor- Ascites	resi- stent	+, mit Tumor- Ascites	resi- stent	+, mit Tumor- Ascites	resi- stent	+, mit Tumor- Ascites	resi- stent
Versuch								
1	0		2		2		2	
2	0	1	1	1	2		3	
3	1		3		1	1	2	
4	0		3		2		3	
5	1		2		2		2	1
6	0		3		2		2	1
7	0		2		2		3	
8	0		1	1	1		0	2
9	0		2		2	1	2	
10	0	1	2		1	1	3	
11	0		1		3		2	
12	0		2		1		2	
13	0	1	2		2		3	
Tumor- rate	2= 6%		26= 70%		23= 64%		29= 83%	
Überle- benszeit (Tage)	15		17		20		13	

- b) Einfluß des Serums mit virulentem Tumorcites geimpfter, mit denaturiertem Tumorcites geimpfter und nicht geimpfter resistenter Ratten und des Serums ebenso geimpfter normaler Ratten

Die erhebliche Verringerung der Impfausbeute (Tab.6) wurde mit dem Serum resistenter Ratten erzielt, die vier Tage vor der Entblutung mit 1,0 ml vitalem Tumorcites geimpft wurden. Um den Einfluß dieser Impfung festzustellen, wurden deshalb in den folgenden Versuchen $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen im Serum resistenter, jedoch nicht vorher geimpfter Ratten incubiert.

Ferner wurden die Tumorzellen im Serum resistenter, vier Tage vorher mit 1,0 ml denaturiertem Tumorcites geimpfter Ratten, im Serum normaler, vier Tage vorher mit 1,0 ml virulentem Tumorcites geimpfter Ratten und im Serum normaler, 4 mal im Abstand von 14 Tagen mit denaturiertem Tumorcites geimpfter Ratten incubiert. Dabei erfolgten bei den zuletzt genannten Impfungen die ersten drei Impfungen mit 0,5 ml, die vierte Impfung mit 1,0 ml denaturiertem Tumorcites. Diese Impfungen wurden also analog zu den vier überstandenen Transplantationen der bisher verwendeten resistenten Ratten durchgeführt.

Damit sollte festgestellt werden, ob die in den beiden letzten Versuchsreihen (Tab.5, Tab.6) erzielte Verringerung der Virulenz der Walker-Carcinomzellen allein eine Fähigkeit des Serums resistenter Ratten sei, oder nach analoger Impfung auch eine Fähigkeit des Serums normaler

Ratten.

Um möglichst exacte Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurden außerdem wie in den Versuchen bisher zugleich die Tumorzellen im Serum resistenter, vier Tage vorher mit 1,0 ml virulentem Tumorcites geimpfter Ratten und im Serum nicht geimpfter normaler Ratten incubiert.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Obwohl an der Versuchsmethode und der Anzahl der Tumorzellen nichts geändert wurde, sind die Tumorraten der nicht incubierten Kontrollzellen, der in Normalserum incubierten Tumorzellen und der Zellen, die im Serum resistenter, mit virulenten Tumorzellen geimpfter Ratten incubiert wurden durchwegs höher als in den Versuchen der Tabelle 6. Die deutliche Differenz zwischen den beiden letzteren besteht jedoch auch hier. Ebenso sind die entsprechenden Überlebenszeiten kürzer.

Die Tumorraten der Zellen, die im Serum nicht geimpfter resistenter Ratten incubiert wurden, ist etwa so hoch wie die Tumorraten der Zellen, die im Serum mit denaturiertem Tumorcites geimpfter resistenter Ratten incubiert wurden. Sie ist jedoch deutlich geringer als die Tumorraten der in Normaleserum incubierten Zellen und wesentlich höher als die Tumorraten der Zellen, die im Serum resistenter, aber mit virulenten Tumorzellen geimpfter Ratten incubiert wurden.

Die Tumorraten der Walker-Carcinomzellen, die im Serum normaler, mit virulenten Tumorzellen geimpfter Ratten incubiert wurden, unterscheidet sich praktisch nicht von

Tabelle 7. Virulenz von je $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen nach Incubation im Serum ungeimpfter, im Serum mit virulentem Tumorascltes geimpfter, im Serum mit denaturiertem Tumorascltes geimpfter resistenter Ratten und im Serum entsprechender normaler Ratten

	Incubations-Sera						Kontrollen	
	Serum resistenter, mit ungeimpfter Tumoren-Ratten	Serum resistenter, mit ungeimpfter Tumoren-Ratten	Serum resistenter, mit ungeimpfter Tumoren-Ratten	Serum resistenter, mit ungeimpfter Tumoren-Ratten	Serum resistenter, mit ungeimpfter Tumoren-Ratten	Serum resistenter, mit ungeimpfter Tumoren-Ratten	Serum resistenter, mit ungeimpfter Tumoren-Ratten	Serum resistenter, mit ungeimpfter Tumoren-Ratten
Impf- Ergebnis	mit Asc.	mit Asc.	mit Asc.	mit Asc.	mit Asc.	mit Asc.	mit Asc.	mit Asc.
Versuch								
1	2							
2	1	2						
3	1	1						
4	1	0						
5	2	2						
6	2	1						
7	1	0						
8	1	1						
9	3	0						
10	2	0						
11	2	0						
12	1	0						
13	2	0						
14	1	1						
15	2	1						
Tumor- rate	26= 59%	7= 17%	27= 66%	40= 93%	37= 90%	41= 95%	42= 98%	
Überle- benszeit (Tage)	10	9	14	11	14	13	7	

+ = 1 Ratte starb ohne Tumorascltes an einer intercurrenten Krankheit.

der Tumorraten der Zellen die im Serum normaler, mit denaturierten Zellen geimpfter Ratten incubiert wurden. Auch ist sie nur etwa so groß wie die der in Normalserum incubierten Zellen.

Auch in dieser Versuchsreihe wurden die Tumorzellen vor und nach der Incubation mit dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Es bestanden wiederum keine morphologischen Unterschiede.

5) Wirkung des Peritoneum-Homogenats resistenter, mit Tumoraszites geimpfter Ratten und normaler Ratten auf die Virulenz von $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen

Um möglicherweise vorhandene lokale, an das Peritoneum gebundene zelluläre Abwehrkräfte zu erfassen, wurden je $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen im Peritoneum-Homogenat resistenter, vier Tage vorher mit virulentem Tumoraszites geimpfter Ratten und im Peritoneum-Homogenat normaler Ratten incubiert.

Das Peritoneum wurde von denselben Versuchstieren gewonnen, die für die in Tabelle 6 zusammengestellten Versuche verwendet wurden. Die Incubation der Tumorzellen im Peritoneum-Homogenat wurde parallel zu diesen Versuchen ausgeführt, so daß die Versuche der Tabelle 6 also als Kontrolle dienten.

Tabelle 8 zeigt das Ergebnis. Die Tumorraten beider Versuchsreihen entsprechen etwa derjenigen der in Normalserum und derjenigen der in Kälberserum incubierten Zellen

von Tabelle 6.

Tabelle 8. Virulenz von je $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen nach Incubation im Peritoneum-Homogenat resistenter, mit Tumorascites geimpfter Ratten und im Peritoneum-Homogenat normaler Ratten (Parallelversuche zu denen der Tabelle 6).

	Incubations-Homogenate			
	Peritoneum-Homogenat resistenter Ratten		Peritoneum-Homogenat normaler Ratten	
Impf-Ergebnis	†, mit Tumor-Ascites	resistent	†, mit Tumor-Ascites	resistent
Versuch				
1	3		3	
2	2		1	
3	2		2	
4	2		2	
5	2		1	
6	3		2	
7	2		2	
8	1		1	1
9	3		3	
10	3		3	
11	2		2	
12	1	1	1	
13	2		2	
Tumor rate	28= 74%		25= 68%	
Überlebenszeit (Tage)	21		17	

Bei allen für die Incubationsversuche als Serumspender verwendeten resistenten Ratten und zum Vergleich auch bei allen normalen Ratten wurde nach der Entblutung die Bauchhöhle untersucht, besonders das Peritoneum, um mögliche Veränderungen z.B. entzündlicher Art als Folge der überstandenen Transplantationen erkennen zu können. Mit Ausnahme von fünf resistenten Ratten konnte jedoch in kei-

nem Fall ein auffallender Befund erhoben werden. Bei zwei dieser fünf Ratten, die sich gegen die drei Test-Tumor-Transplantationen als resistent erwiesen hatten, wurde als Folge der vierten vier Tage vorher erfolgten Tumor-Transplantation, ein geringer chylöser Tumorascites festgestellt, bei den übrigen drei Ratten ein massiv hämorrhagischer Tumorascites.

B; Beeinflussung der gegen das Walker-Ascites-Carcinom bestehenden Resistenz von Ratten durch Cortisonbehandlung

10 resistenten und 10 normalen Ratten wurde täglich 6 mg Cortison injiziert. Am 5., 12. und 19. Tag wurden die resistenten Ratten, und am 5. Tag auch die normalen Ratten mit je 0,5 ml Tumorascites geimpft. Parallel zu jeder Transplantation wurden jeweils drei unbehandelte Kontrollratten geimpft. Tabelle 9 enthält eine Übersicht.

Von den 10 resistenten Ratten starb nur eine mit Tumorascites. Drei starben ohne Ascites, die restlichen überlebten. Sämtliche normalen Ratten und alle Kontrolltiere starben mit einem Tumorascites.

C: Beeinflussung der Resistenz von Ratten gegen das Walker-Ascites-Carcinom durch Milzexstirpation

Bei 11 resistenten und 11 normalen Ratten wurde die Milz exstirpiert. Am 3. Tag nach der Operation wurden

diese Tiere mit je 0,5 ml Tumorascites geimpft. Die resistenten Ratten wurden außerdem noch drei mal im Abstand von 7 Tagen mit der gleichen Tumormenge geimpft. Parallel zu jeder Transplantation wurden jeweils drei Kontrolltiere geimpft.

Alle normalen Ratten und alle Kontrolltiere starben mit einem Tumorascites. Alle resistenten Ratten überlebten.

Tabelle 9. Einfluß einer Cortisonbehandlung auf die Resistenz von Ratten gegen das Walker-Ascites-Carcinom

Tage	10 resistente Ratten				10 normale Ratten			
	Injektion v. Cortison	Tumor-Transplantation	Ergebnis *, mit Tumor-Ascites	*, ohne Tumor-Asc.	Injektion v. Cortison	Tumor-Transplantation	Ergebnis *, mit Tumor-Asc.	*, ohne Tumor-Asc.
1	↓				↓			
2	↓				↓			
3	↓				↓			
4	↓				↓			
5	↓	↓			↓	↓		
6	↓				↓			
7	↓				↓			
8	↓				↓			
9	↓				↓			
10	↓			1	↓		2	
11	↓				↓		5	
12	↓	↓	1		↓			
13	↓				↓		2	
14	↓				↓			
15	↓				↓		1	
16	↓							
17	↓							
18	↓							
19	↓	↓						
20	↓							
21	↓							
22	↓			1				
23	↓			1				
24	↓							

↓ = Impfung mit 0,5 ml Tumorascites bzw. mit 6 mg Cortison.

DISCUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

In der ersten Versuchsreihe (Tab. 1) wurde nach Incubation von 9×10^7 Zellen des Walker-Ascites-Carcinoms im Blutserum resistenter Ratten, normaler Ratten und in Kälberserum, und anschließender Überimpfung auf normale Ratten keine auffallende Differenz in den Tumorraten der incubierten Zellen festgestellt. Auch eine Impfung der resistenten Ratten mit virulenten Tumorzellen vier Tage vor der Entblutung führte zu keiner Änderung (Tab. 2). Ebenso war eine massive Impfung der resistenten Ratten (Tab. 3) erfolglos und auch die Incubation von 9×10^7 Zellen im Gesamtblut geimpfter resistenter Ratten hatte keine Herabsetzung der Tumorraten zur Folge (Tab. 4).

Durch eine Verringerung der incubierten Tumorzellzahl auf 3×10^7 Zellen (Tab. 5) und in einer weiteren Versuchsserie auf $1,5 \times 10^6$ Zellen (Tab. 6) gelang es jedoch die Tumorraten der Zellen erheblich zu reduzieren, die im Serum vier Tage vor der Entblutung geimpfter resistenter Ratten incubiert wurden.

Ein Vergleich zwischen der Tumorraten der im Serum normaler, nicht geimpfter Ratten incubierten Zellen und derjenigen der in Kälberserum incubierten Zellen zeigt in keinem unserer Versuche eine verwertbare Differenz. Die Größe des Unterschiedes gegenüber den Impfausbeuten die mit den nicht incubierten Kontrollzellen erzielt wurde, ist in allen Versuchen ziemlich konstant und kann ebenso wie die Differenz in den durchschnittlichen Überlebenszeiten

als Maß für die durch die 24stündige Incubation bedingte Verringerung der Virulenz der Tumorzellen betrachtet werden. In Anbetracht dieser Verringerung ist die mit $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen (= 0,0083 ml Tumorascentes pro beimpfter Ratte) erzielte Impfausbeute sehr hoch. Bei Verwendung von nur $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen ist es möglich, den Unterschied zwischen der Tumorrates der im Serum normaler Ratten incubierten Zellen und der Tumorrates der im Serum geimpfter resistenter Ratten incubierten Zellen überzeugend deutlich zu machen.

Die bisher angeführten Versuchsergebnisse zeigen also, daß 3 ml Blutserum resistenter, mit virulentem Tumorascentes geimpfter Ratten unter den Versuchsbedingungen im Vergleich zum Blutserum normaler Ratten die Fähigkeit besitzen, die Virulenz der Walker-Ascites-Carcinomzellen zu verringern. Bei Incubation von $1,5 \times 10^6$ Zellen ist diese hemmende Wirkung von 3 ml Blutserum so groß, daß die Virulenz dieser Zellen weitgehend aufgehoben ist (Tab. 6). In einem Bereich von 3×10^7 Tumorzellen ist sie noch deutlich sichtbar, während bei Incubation von 9×10^7 Zellen nichts mehr von ihr feststellbar ist.

Die vier Tage vor der Entblutung geimpften resistenten Ratten verfügen also offenbar zum Zeitpunkt der Entblutung über einen humoralen, nicht an die Blutzellen gebundenen cytotoxischen Abwehrfaktor, der in ganz bestimmter Konzentration vorliegt. Danach reicht die in 3 ml Serum vorhandene Menge aus, um während 24stündiger Incubation die Virulenz von mindestens $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen so zu verrin-

gern, daß eine anschließende Transplantation praktisch zu keinem Wachstum der Zellen mehr führt. Danach liegt möglicherweise auch bei Incubation von 9×10^7 Zellen die gleiche Konzentration des Abwehrfaktors in ausreichendem Maß vor. Seine Wirkung wird durch die entsprechenden Tumorraten jedoch nicht sichtbar, da offenbar zu viele in ihrer Virulenz unbeeinflusste Tumorzellen übrig bleiben.

Für das Walker-Ascites-Carcinom gilt wie für alle Impftumoren die bekannte Tatsache, daß die Impfausbeute nach der Transplantation der Tumorzellen umso geringer ist, je kleiner die Anzahl der überimpften Zellen ist (BAUER (3), SCHMÄHL (41)). Daraus geht hervor, daß auch normale Ratten über eine Abwehrkraft gegen maligne Impfgeschwülste verfügen. Sie versagt allerdings bei Transplantation sehr hoher Zellzahlen.

Die Tumorraten der Kontrollzellen und die der in Normal serum und Kälberserum incubierten Zellen ist bei Überimpfung von $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen (Tab. 6) und von 3×10^7 Tumorzellen (Tab. 5) auf je drei Ratten jeweils geringer als die entsprechende Tumorraten von 9×10^7 Zellen (Tab. 1 u. 2). Damit zeigen auch diese Ergebnisse die in diesem Bereich von Zellzahlen bereits sichtbar werdende Abwehrkraft der normalen Ratten, auf die die incubierten Tumorzellen verimpft wurden.

Die Existenz von Abwehrkräften normaler Ratten zeigt auch die Tatsache, daß zur erfolgreichen intraperitonealen Übertragung von Impftumoren weit weniger Zellen nötig sind als zur intravenösen. Genauere Untersuchungen am Yoshida-Ascites-Carcinom und am Walker-Ascites-Carcinom wurden

diesbezüglich u.a. von SCHMÄHL (41) durchgeführt.

Wie der Vergleich mit der Wirkung des Kälberserums gezeigt hatte, vermochte das Serum der normalen Ratten jedoch die Virulenz der Tumorzellen nicht herabzusetzen.

Der Wirkung des Normalserums wurde in den bisher besprochenen Versuchsergebnissen die deutlich hemmende Wirkung des Serums resistenter Ratten gegenübergestellt, die insgesamt vier Tumor-Transplantationen überstanden hatten. Durch diese vier Transplantationen konnte es möglicherweise unabhängig von der primären Resistenz-Abwehrreaktion, vielleicht erst jeweils nach Zerstörung der Tumorzelle, im Serum der resistenten Ratten über eine Sensibilisierung der Tiere durch Bestandteile der Tumorzelle zu einer Anreicherung von Antikörpern gekommen sein, die während der Incubation die geschilderte Verringerung der Virulenz der Tumorzellen bewirkten. Demnach wäre die festgestellte Hemmwirkung nicht eine charakteristische humorale Eigenschaft resistenter Ratten. Denn es bestand die Möglichkeit, daß das Serum ziemlich analog geimpfter normaler Ratten in ähnlicher Weise die Virulenz der Tumorzellen zu verringern vermochte. Ferner war es möglich, daß die normalen Ratten nach Transplantation virulenter Tumorzellen ähnliche humorale Abwehrstoffe mit derselben Wirkung entwickeln. Die in Tabelle 7 zusammengestellten Versuchsergebnisse schließen diese Möglichkeit aus.

Bei ihrer Auswertung ist zunächst zu berücksichtigen, daß entsprechend der Feststellung EHRLICHS (14), das Wachstum einer Geschwulst sei als Produkt aus Tumorigenität

und Tierresistenz zu betrachten, in dieser Versuchsreihe die Virulenz der Tumorzellen größer oder die Widerstandsfähigkeit der mit den incubierten Zellen geimpften Ratten geringer war als bei den Versuchen der Tabelle 6. Denn sowohl die Tumorrates der nicht incubierten Kontrollzellen als auch diejenige der in Normalserum incubierten Zellen liegt, obwohl auch hier nur $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen incubiert wurden, deutlich höher als in Tabelle 6. Wohl aus demselben Grund sind auch die durchschnittlichen Überlebenszeiten kürzer. Ein Vergleich zwischen den Versuchsergebnissen von Tabelle 6 und Tabelle 7 ist deshalb nur bedingt möglich. Diese Schwankung von Resistenz und Virulenz zeigt jedoch, wie notwendig für brauchbare Vergleichsmöglichkeiten der große Aufwand von Kontrollversuchen ist.

Während die Virulenz der Tumorzellen durch die Incubation im Serum resistenter, mit virulenten Tumorzellen geimpfter Ratten wieder erheblich herabgesetzt wurde, geschah dies durch die Incubation im Serum ungeimpfter resistenter Ratten zwar auch noch, aber in deutlich geringerem Ausmaß. Dieses Ergebnis zeigt also eindeutig die Abhängigkeit des Ausmaßes der depressiven Wirkung des Serums resistenter Ratten von der vorher erfolgten Impfung.

Der humorale Abwehrfaktor der resistenten Ratten liegt also offensichtlich vor der Impfung mit virulenten Tumorzellen in einer entsprechend geringeren Konzentration vor, die durch eine Impfung vier Tage vor der Entblutung wesentlich erhöht werden kann.

Dieses Ergebnis entspricht Versuchsergebnissen

von ROTHDACH (39), der zeigen konnte, daß in vitro das Serum resistenter, vier Tage vor der Entblutung mit virulentem Tumorcites geimpfter Ratten, nicht jedoch das Serum ungeimpfter resistenter Ratten, den Phosphateinbau in Walker-Carcinomzellen zu steigern vermag. Es ist also möglich, daß ein Zusammenhang zwischen dem Phosphatstoffwechsel in der Tumorzelle und dem Einwirken des humoralen Abwehrfaktors auf diese besteht.

Die entsprechend den oben angestellten Überlegungen durchgeführte Impfung der normalen Ratten ergab, daß weder das Serum mit denaturiertem Tumorcites geimpfter normaler Ratten noch das Serum mit virulentem Tumorcites geimpfter normaler Ratten eine hemmende Wirkung auf die Virulenz der Tumorzellen hat.

Somit wurde in keinem unserer Versuche die Wirkung eines humoralen Abwehrstoffes normaler Ratten nachgewiesen.

Damit dürfte es sich bei der festgestellten Hemmwirkung auf die Virulenz tatsächlich um eine charakteristische Fähigkeit des Serums resistenter Ratten handeln.

Als Kontrolle zu den mit denaturiertem Tumorcites geimpften normalen Ratten erfolgte die Impfung von resistenten Ratten mit denaturiertem Tumorcites. Das Serum dieser resistenten, mit denaturiertem Tumorcites geimpften Ratten weist zwar noch einen gewissen Hemmeffekt auf. Dieser ist jedoch nur in der Größenordnung desjenigen im Serum ungeimpfter resistenter Ratten. Durch eine Impfung mit denaturiertem Tumorcites wird im Gegensatz zu einer Impfung

mit virulentem Tumorcites offenbar die Konzentration des humoralen Abwehrfaktors nicht erhöht. Es ist deshalb denkbar, daß die Aktivierung humoraler Abwehrfaktoren resistenter Ratten im Unterschied zu tumorspezifisch immunisierten Tieren nur durch vitale Tumorzellen und nicht auch durch totes Tumormaterial möglich ist.

Diejenigen resistenten Ratten, die nicht vier Tage vor der Entblutung geimpft wurden, hatten insgesamt drei Transplantationen vitaler Tumorzellen überstanden, wobei die letzte Transplantation vier Wochen vor dem Entblutungstag lag. Die schwächere Wirkung des Serums dieser resistenten Ratten wäre demnach möglicherweise durch Abwehrfaktoren bedingt, die nicht primär vorhanden waren, sondern deren Bildung durch diese drei Transplantationen hervorgerufen wurde und deren Konzentration im Laufe von vier Wochen absank.

Der Anteil der jeweils in den Versuchen gegen eine Transplantation der verschieden incubierten Zellen sowie gegen zwei weitere Transplantationen als resistent erkannten Ratten ist etwa gleich groß. Er beträgt, ebenso wie der Anteil der gegen die Transplantation der nicht incubierten Kontrollzellen und zweier weiterer Transplantationen resistenten Ratten, zwischen 7 und 8%. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Verimpfung der in den verschiedenen Blutsera incubierten Tumorzellen keinen Einfluß auf die Höhe des endgültigen Prozentsatzes resistenter Ratten hat, wie dies z.B. bei der Verimpfung der im Serum resistenter Ratten incubierten Zellen etwa im Sinne einer passiven Immunisierung denkbar wäre.

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse wurde

nicht berücksichtigt, daß deshalb etwa 7-8% der Tiere, von denen wir das Normalserum gewannen, resistent sein konnten. Dieser Prozentsatz ist jedoch relativ klein. Außerdem hatten ja die Versuche ergeben, daß erst nach einer Impfung mit virulenten Tumorzellen die Wirkung eines Abwehrfaktors besonders deutlich wird. Eine Berücksichtigung dieses Prozentsatzes würde also lediglich bedeuten, daß die Differenz zwischen den Tumorraten der in Normalserum incubierten Zellen und denjenigen der im Serum resistenter Ratten incubierten Zellen noch etwas größer ist als es die Versuche ergaben.

Bei Incubation von 3×10^7 Zellen in 3 ml Serum mit virulentem Tumorscites geimpfter resistenter Ratten ist die Wirkung des humoralen Abwehrfaktors nur noch schwach (Tab. 5), bei Incubation von 9×10^7 Zellen überhaupt nicht mehr sichtbar (Tab. 2), da, wie weiter oben schon festgestellt wurde, seine Konzentration offenbar zu gering ist. Auch 3 ml Serum massiv geimpfter resistenter Ratten (Tab. 3) und 5 ml Gesamtblut geimpfter resistenter Ratten mit seinen zellulären Bestandteilen hat keine depressive Wirkung auf die Virulenz von 9×10^7 Tumorzellen.

Die resistenten Ratten sind jedoch gegen eine Übertragung viel höherer Zellzahlen resistent (JUNKMANN (24)).

Wir selbst überimpften zur Orientierung auf drei resistente Ratten je 6 ml Tumorscites, also etwa $3,6 \times 10^8$ Zellen. Alle drei Ratten überstanden die Transplantation symptomlos.

Bei allen Versuchen stellt die in 3 ml Serum vorhandene Menge des Abwehrfaktors natürlich nur einen Teil der insgesamt im Serum der resistenten Ratten vorhandenen

Menge dar, und mit dem Gewinnen des Blutserums vier Tage nach der letzten Transplantation wird nur die zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt bestehende Abwehrlage der resistenten Ratten erfaßt. Die Wahl eines anderen Zeitpunktes für die Entblutung würde vielleicht eine stärkere Wirkung des Serums zur Folge haben. In vitro stellt die Transplantation von Tumorzellen ausserdem wahrscheinlich einen Reiz für die Produktion von Abwehrstoffen dar, die zumindest so lange anhält bis die Tumorzellen vernichtet sind.

Es wäre angesichts der starken Abwehrkraft der resistenten Ratten, die ja ihre Resistenz gegen intraperitoneale Transplantationen bewiesen hatten, auch möglich, daß zusätzlich das Peritoneum eine organspezifische Abwehrkraft besäße. Bei den normalen Ratten ist dies umso mehr denkbar, als bei ihnen in unseren Versuchen keine humorale Abwehrkraft verzeichnet werden konnte. Die Ergebnisse der Versuche, in denen die Tumorzellen in Homogenaten des Peritoneums resistenter und normaler Ratten parallel zu den Incubationen im Serum der gleichen Tiere incubiert wurden (Tab. 6 und 8), lassen diese Möglichkeiten jedoch unwahrscheinlich erscheinen. Danach ist die Resistenz der Ratten gegen intraperitoneale Transplantationen des Walker-Ascites-Carcinoms humoral bedingt und eine eventuell vorhandene peritoneale oder humorale Abwehrkraft der normalen Ratten so gering, daß sie bei unseren Versuchsbedingungen nicht sichtbar wird.

Mit dem Phasenkontrastmikroskop wurden keine Unterschiede in der Morphologie der in den verschiedenen Medien incubierten Tumorzellen festgestellt. Demnach findet eine

strukturelle Veränderung der Zellen und ihre völlige Zerstörung erst nach der Rücktransplantation der Tumorzellen unter in vivo-Bedingungen statt.

Bei der Discussion der Ergebnisse wurde bisher z.T. vorausgesetzt, daß die Verringerung der Virulenz weitgehend identisch ist mit der tatsächlich in vivo ablaufenden Resistenz-Abwehrreaktion. Durch folgende Denkmöglichkeit wird diese Identität aber zunächst in Frage gestellt: Eine deutliche hemmende Wirkung des Serums resistenter Ratten trat erst nach vier Tage vor der Entblutung erfolgter Impfung mit virulenten Tumorzellen auf. Diese Impfung konnte nach der eigentlichen primären Abwehrreaktion zu einer Überflutung des Blutes mit toxischen Abbauprodukten der Tumorzellen geführt haben, die bei den Incubationsversuchen wirksam wurden und die primäre Resistenz-Abwehr vortäuschten. Dagegen spricht jedoch, daß einerseits das Serum mit denaturiertem Tumorscites geimpfter resistenter Ratten eine ebenso geringe Hemmfähigkeit zeigt wie das Serum ungeimpfter resistenter Ratten und andererseits das Serum mit denaturiertem Tumorscites geimpfter und das Serum mit virulentem Tumorscites geimpfter normaler Ratten keine Hemmfähigkeit hat.

Die resistenten Ratten überstehen die Tumortransplantationen symptomlos. Bei allen resistenten und zum Vergleich auch bei allen normalen Ratten wurde makroskopisch nach der Entblutung die Bauchhöhle untersucht, um mögliche Veränderungen der Bauchorgane, z.B. entzündlicher Art, zu erfassen. Jedoch konnte vor allem auch bei den vier Tage

vor der Entblutung mit virulenten Tumorzellen geimpften resistenten Ratten mit Ausnahme von fünf resistenten Ratten keine Veränderung festgestellt werden. Dies zeigt, daß die Abwehrreaktion offensichtlich sehr rasch einsetzt und sehr schnell zur Vernichtung der Tumorzellen führt ohne makroskopische Veränderungen zu hinterlassen. Drei der fünf resistenten Ratten bekamen nach der 4. Transplantation noch einen massiven, hämorrhagischen Tumorascites. Sie verloren durch unerklärbare aber häufig beschriebene biologische Schwankungen ihre Resistenz. Bei zwei der fünf resistenten Ratten, die einen geringen chylösen Tumorascites zeigten, setzte die Abwehrreaktion wohl nur langsam ein. Einige Tage später wäre der Ascites möglicherweise verschwunden gewesen. Bekannt ist dieser Vorgang u. a. beim Goldhamster (WRBA und RABES (54)). Er reagiert auf eine heterologe Transplantation des Walker-Carcinoms mit einem starken Tumorascites, der sich bei den meisten Tieren etwa am 5. Tag wieder zurückbildet.

In der Einleitung wurde dem weitgehend ungeklärten Resistenzphänomen die Tumorummunität und die Transplantationsimmunität gegenübergestellt, worüber schon genauere Vorstellungen bestehen. Die Ergebnisse der Versuche mit resistenten Ratten bieten sich nun z.T. für eine Deutung im Sinne immunologischer Vorgänge an. So kann die Hemmwirkung des Serums resistenter Ratten entsprechend den "cytotoxischen Antikörpern" der Tumorummunologie (SCHMIDT (43)) als Wirkung ähnlicher Antikörper betrachtet werden, deren Bildung durch die Tumorzellen als Antigene hervorgerufen wird. Die beson-

ders starke cytotoxische Wirkung des Serums nach Impfung der resistenten Ratten mit virulenten Tumorzellen erinnert wiederum an den Booster-Effekt, dem durch Applikation von Antigenen hervorgerufenen Anstieg der entsprechenden Antikörper-Konzentration nach vorausgegangener Sensibilisierung. Die geringere Wirkung des Serums nicht geimpfter resistenter Ratten wäre dann durch eine allmählich niedriger gewordene Konzentration von Antikörpern bedingt. Ob bzw. in wie weit jedoch tatsächlich sich exakt entsprechende Vorgänge bei der Abwehrreaktion resistenter Ratten und der immunisierter Ratten bestehen, kann aus den Versuchsergebnissen nicht entnommen werden.

Verschiedene Autoren berichten, daß die Immunität von Versuchstieren gegen Impftumoren durch Cortisonbehandlung aufgehoben werden kann (RUBNER (40), SCHMÄHL (42)). TOOLAN (49) konnte durch tägliche Applikation von 6 mg Cortison die Transplantationsimmunität von Ratten gegen menschliche Tumoren durchbrechen. Ferner sollen Impftumoren und andere Tumoren bei Cortisonbehandlung (IVERSEN (23), RUBNER (40), WATNE (50)) und nach Milzexstirpation (APOLANT (2), (BÜNGELER (8), BRÜDA (6 und 7), SCHMÄHL (42)) leichter und schneller wachsen und eher heterotransplantabel sein. Durch hohe Dosen lymphoider Zellen, die aus dem Lymphknoten oder der Milz immunisierter Tiere präpariert wurden, soll der Schutzeffekt dieser Tiere übertragbar sein (PASTERNAK (34)).

Entsprechend diesen Befunden, die den Einfluß des Cortisons und der Milzfunktion auf die Immunität gegen Impftumoren zeigen, wurde der Einfluß auf die Resistenz der Rat-

ten durch Injektion von Cortison (Tab. 8) bzw. durch Milzexstirpation geprüft.

Nur bei einer Ratte trat entweder als Folge der Cortisonbehandlung oder durch eine schon oben erwähnte biologische, unerklärbare Resistenz-Schwankung ein Tumorascites auf, obwohl die sehr hohe Dosis von 6 mg Cortison injiziert wurde. Wie hoch diese Dosis ist, wird durch die schon oben angeführten Versuchsergebnisse von TOOLAN (49) veranschaulicht, an denen wir uns hinsichtlich der Dosierung orientierten. Sie transplantierte erfolgreich für einige Zeit menschliches Tumorgewebe auf Ratten, denen täglich 6 mg Cortison injiziert wurde, was sonst aber nur bei röntgenbestrahlten und täglich mit 3 mg Cortison behandelten Ratten möglich war.

Die bekannte durch das Cortison hervorgerufene allgemeine Herabsetzung der Widerstandsfähigkeit zeigt sich darin, daß drei Tiere ohne Tumorascites an einer intercurrenten Krankheit starben.

Cortison in hohen Dosen kann das Wachstum von Tumoren verhindern (BOUTWELL (45), SELYE (44)). Dies war bei den überlebenden resistenten Ratten aber offenbar nicht der Fall, da bei sämtlichen cortisonbehandelten normalen Ratten die Tumorzellen wuchsen.

Dieses Ergebnis betont noch zusätzlich den Unterschied zwischen resistenten Ratten und immunisierten Tieren. Falls das reticuläre System auch für die Resistenz verantwortlich wäre, so verfügte das resistenter Ratten offensichtlich über weit größere Abwehrpotenzen als das normaler immu-

nisierter Ratten.

Auch die Milzexstirpation blieb ohne Einfluß auf die Resistenz. Dieses Ergebnis steht in gewissem Widerspruch zu Ergebnissen von APOLANT (2), der die Resistenz von Nul-ler-Mäusen durch Milzexstirpation aufheben konnte. Falls die Milzfunktion einen Einfluß auf die Resistenz hat, kann ihr Ausfall vielleicht sofort durch die Funktion anderer Teile des reticulären Systems kompensiert werden.

Versuche anderer Autoren, die Resistenz von Rat-ten durch Parabiose zu übertragen, blieben ohne Erfolg (WRBA und RABES (51), RABES (38), ALBER (1)). Die Para-bioseratten wurden bei diesen Versuchen mit etwa 0,5 ml Tumorascites, also etwa 3×10^7 Zellen geimpft. Vielleicht würden entsprechend unseren Ergebnissen Parabioseversuche erfolgreich verlaufen, bei denen die Resistenz mit Trans-plantation wesentlich geringerer Tumorzahlen getestet wird und bei denen zugleich die resistenten Ratten vier Ta-ge vor der Testtransplantation mit virulenten Tumorzellen geimpft werden. Die Folgerung, daß gemäß den negativ ver-laufenen Parabioseversuchen humorale Abwehrfaktoren resi-stenter Ratten unwahrscheinlich seien und es sich um eine an das Gewebe fixierte Resistenz handle, bedarf nach un-seren Ergebnissen der Berichtigung.

Über das Wesen der Resistenz können vorerst nur Vermutungen angestellt werden. Aus immunologischer Sicht können verschiedene Prozesse, wie immunologische Toleranz (NAIRN und Mitarbeiter (33), MEDAWAR (31)), Immunparalyse (Unterdrückung der Abwehr gegen bestimmte Tumorantigene)

(FELTON (15), MITCHISON (32)) oder immunologischer "Enhancement"-Effekt (Wachstumsförderung durch einen bestimmten Immunprozess) (KALISS (25)) das progressive Wachstum eines Tumors ermöglichen. Falls es sich bei der Resistenz um einen immunologischen Vorgang handelt, spielen bei den resistenten Ratten diese Prozesse vielleicht nur eine untergeordnete Rolle. Aus neuerer Zeit stammen unbestätigte Berichte über die Vererbbarkeit der Resistenz gegen das Walker-Carcinom und zugleich gegen das Jensen-Sarkom (MATTHIES und PFORDTE (29), MATTHIES und PETERS (30)).

In weiteren Untersuchungen wäre wohl zunächst u.a. exakt zu klären, in wieweit die Resistenz tumorspezifisch ist. Bei Verwendung von Impftumoren muß bekanntlich stets mit wesentlichen, z.T. genetisch bedingten Eigenschaftsänderungen der Tumorzellen gerechnet werden (PASTERNAK (34), WRBA und RABES (54)). Es ist deshalb durchaus denkbar, daß die Resistenzabwehr vielmehr gegen eine allmählich entstandene Individualfremdheit als gegen die Malignität der Tumorzellen gerichtet ist. Es wurde erwähnt, daß diese Möglichkeit bei der Unterscheidung von Tumor- und Transplantationsimmunität berücksichtigt werden muß. Andererseits ist es aber auch denkbar, daß diese Möglichkeit gerade bei unserem Walker-Carcinom nur eine untergeordnete Rolle spielt, da es auf Ratten der verschiedensten Stämme und auch auf Mäusen und Goldhamstern wächst (WRBA und RABES (53)). Die Ursache dafür könnte im Verlust von artspezifischen, dominanten Histokompatibilitätsgenen begründet sein, während die Malignität der Zellen erhalten blieb und nun die entscheidende Rolle spielt.

ZUSAMMENFASSUNG

In vitro wurden Walker-Ascites-Carcinomzellen im Blutserum gegen dieses Carcinom resistenter Ratten, im Blutserum normaler Ratten, in Kälberserum und im Peritoneum-Homogenat resistenter und normaler Ratten incubiert. Die Wirkung der Incubation auf die Virulenz der Tumorzellen wurde durch anschließende Überimpfung auf normale Ratten geprüft.

Die Incubation von 9×10^7 Tumorzellen im Serum nicht geimpfter, im Serum einmal mit virulentem Tumorascites geimpfter und im Serum mehrfach mit virulentem Tumorascites geimpfter resistenter Ratten sowie die Incubation im Gesamtblut mit virulentem Tumorascites geimpfter resistenter Ratten hat keinen Einfluß auf die Virulenz der Tumorzellen.

Die Virulenz von 3×10^7 Tumorzellen wird durch das Serum resistenter, vier Tage vor der Entblutung mit virulentem Tumorascites geimpfter Ratten deutlich verringert, die von $1,5 \times 10^6$ Zellen fast völlig aufgehoben.

Die Wirkung des Serums nicht geimpfter resistenter Ratten und die Wirkung des Serums mit denaturiertem Tumorascites geimpfter resistenter Ratten auf die Virulenz von $1,5 \times 10^6$ Zellen ist etwa gleich groß und wesentlich geringer als die des Serums mit virulentem Tumorascites geimpfter resistenter Ratten.

Die Incubation von 9×10^7 , 3×10^7 und $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen im Serum normaler Ratten hat keinen Einfluß auf die Virulenz.

Die Virulenz von $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen wird auch durch das Serum mit virulenten Tumorzellen geimpfter und mit denaturiertem Tumorscites geimpfter normaler Ratten nicht verringert.

Die resistenten Ratten verfügen demnach über einen humoralen cytotoxischen Abwehrfaktor, der nicht an die Blutzellen gebunden ist. Seine Konzentration kann durch eine Impfung mit virulentem Tumorscites wesentlich erhöht werden, nicht jedoch durch eine Impfung mit denaturiertem Tumorscites.

Diesen Versuchsergebnissen nach ist es möglich, daß der Resistenz-Abwehrreaktion ein immunologischer Vorgang zugrunde liegt.

Eine Wirkung humoraler Abwehrkräfte normaler Ratten konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Incubation von $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen im Peritoneum-Homogenat mit virulentem Tumorscites geimpfter resistenter Ratten und normaler Ratten hat keine depressive Wirkung auf die Virulenz der Tumorzellen. Organspezifische, an das Gewebe fixierte Abwehrfähigkeiten des Peritoneums resistenter und normaler Ratten konnten somit nicht nachgewiesen werden.

Bei Beobachtung der verschieden incubierten Tumorzellen mit dem Phasenkontrastmikroskop zeigen sich keine unterschiedlichen morphologischen Veränderungen. Die Zerstörung der Tumorzellen findet offenbar erst unter in vivo-Bedingungen nach Rücktransplantation der incubierten Tumorzellen statt.

Die Anteile der Ratten, die die Versuche als resistent überlebten, sind etwa gleich groß. Eine passive Immunisierung der Ratten durch die Injektion des Serums resistenter Ratten kann somit ausgeschlossen werden.

Die Überlebenszeiten der mit den verschieden incubierten Tumorzellen geimpften Ratten zeigen in den jeweiligen Versuchsreihen keine Differenz.

Die Virulenz sämtlicher incubierten Tumorzellen wurde unabhängig von der Art des Serums durch den 24 Stunden dauernden Incubationsvorgang herabgesetzt.

Eine überstandene intraperitoneale Transplantation der Tumorzellen hinterläßt keine makroskopische Veränderungen der Bauchorgane.

Durch Cortisonbehandlung oder Milzexstirpation kann die bestehende Resistenz nicht durchbrochen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ALBER, G.: Inaug. Diss. München 1966
- 2) APOLANT, H.: Dtsch. med. Wschr. 30, 454 (1904)
- 3) BAUER, K.H.: Das Krebsproblem, Heidelberg 1963
- 4) BICHEL, J. and I. HOLM-JENSEN: Acta path. microbiol. scand. 26,
319 (1949)
- 5) BOUTWELL, R.K. and RUSH, H.P.: Proc. Amer. Ass. Canc. Res. 1,
5 (1953)
- 6) BRÜDA, B.: Z. Krebsf. 34, 185 (1931)
- 7) BRÜDA, E.B.: Klin. Wschr. 7, 27 (1928)
- 8) BÜNGELER, W.: Frankf. Zschr. Path. 39, 314 (1930)
- 9) BÜNGELER, W.: Med. Welt 12, 1587 und 1625 (1938)
- 10) DOMAGK, G. und HACKMANN, C.: Z. Krebsf. 42, 192 (1935)
- 11) DOMAGK, G.: Z. Krebsf. 56, 247 (1949)
- 12) DOMAGK, G.: In Hdbch. allg. Path. 6, 242 (1956) Springer Verlag
- 13) DRUCKREY, H., HAMPERL, H., HERKEN, H. und RAREI, B.: Z. Krebsf.
48, 451 (1939)
- 14) EHRLICH, P.: Arb. kgl. Inst. Frankfurt a. M. 1, 77 (1906)
- 15) FELTON, I.D.: J. Immunol. 61, 107 (1949)
- 16) FROHBERG, H. und E. MATTHIES,: Z. Krebsf. 61, 280 (1956)
- 17) FROHBERG, H. und E. MATTHIES: Naturwiss. 44, 496 (1957)
- 18) FURTH, O.B., W.A. BARNES and A.B. BROWER: Arch. Path. Chicago
29, 163 (1940)
- 19) GORER, P.A., S. LYMAN and G.D. SNELL: Proc. Roy. Soc. B.
135, 499 (1948)
- 20) HABEL, K.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 106, 722 (1961)
- 21) HACKMANN, C.: Z. Krebsf. 54, 132 (1944)
- 22) HARRIS, M.: Canc. Res. 3, 546 (1943)

- 23) IVERSEN, H.G.: Brit. J. Canc. 10, 472 (1956)
- 24) JUNKMANN, K.: Naunyn-Schmiedebergers Arch. exp., Path. Pharmak.
205, 276 (1948)
- 25) KALISS, N.: Canc. Res. 18, 992 (1958)
- 26) KLEIN, G., H.O. SJÖGREN: Canc. Res. 20, 452 (1960)
- 27) KLEIN, G., H.O. SJÖGREN und E. KLEIN: Canc. Res. 22, 955 (1962)
- 28) LETTRE, H.: Z. Krebsf. 57, 1 (1950)
- 29) MATTHIES, E. und K. PFORDTE: Naturwiss. 48, 433 (1961)
- 30) MATTHIES, E. und J.E. PETERS: Naturwiss. 3, 98 (1963)
- 31) MEDAWAR, P.B.: Folia. biol. 7, 1 (1961)
- 32) MITCHISON, N.A.: Brit. med. Bull. 17, 102 (1961)
- 33) NAIRN, R.C., H.G. RICHMOND, M.G.Mc. ENTEGART and J.E. FOTHERGILL:
Brit. Med. J. 1335 (1965)
- 34) PASTERNAK, G.: "Neue Aspekte der immunolog. Krebsf.", Vortrag vom
23. Nov. 1962 in der Section f. Geschwulstkrankh.
d. Deutsch. Akad. d. Wissensch. Berlin
- 35) PASTERNAK, G., K.H. HORN und A. GRAFFI: Acta biol. med. germ.
9, 302 (1962)
- 36) PREHN, R.T. and J.R. RAIN: J. nat. Canc. Inst. 18, 769 (1957)
- 37) PRINCE, J.E., J.C. FARDON, L.G. NUTINI and G.S. SPRTI: Canc. Res.
17, 312 (1957)
- 38) RABES, H.: Z. Krebsf. 64, 191 (1961)
- 39) ROTHDACH, : Inaug. Diss. München 1956
- 40) RUBNER, O.: Ärztl. Forschg. 12, 245 (1958)
- 41) SCHMÄHL, D.: Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren,
Aulendorf i. Württ. 1963
- 42) SCHMÄHL, D. und T. RIESEBERG: Z. Krebsf. 62, 456 (1958)
- 43) SCHMIDT, H.: Fortschritte der Serologie, Darmstadt, Steinkopf 1955

- 44) SELYE, H.: J. nat. Cancer Inst. 20, 551 (1958)
- 45) SJÖGREN, H.O.: Virology 15, 214 (1961)
- 46) SNELL, G.D.: J. Genetics 49, 87 (1948)
- 47) SNELL, G.D.: Canc. Res. 12, 543 (1952)
- 48) SNELL, G.D.: J. nat. Canc. Inst. 14, 691 (1953)
- 49) TOOLAN, H.W.: Canc. Res. 14, 660 (1954)
- 50) WATNE, A.L., G.E. MOORE, R.J. OLIVER and T. KONDO: Arch. Surg.
82, 478 (1961)
- 51) WRBA, H. und H. RABES: Z. Krebsf. 63, 215 (1960)
- 52) WRBA, H. und H. RABES: Z. ges. exp. Med. 133, 316 (1960)
- 53) WRBA, H. und H. RABES: Z. Krebsf. 65, 17 (1962)
- 54) WRBA, H. und H. RABES: Z. Krebsf. 65, 316 (1963)

Es sei mir am Schluß meiner Arbeit gestattet, meinen besonderen Dank Herrn Professor Dr. Dr. H. Wrba für die Überlassung des Themas und die großzügige Förderung meiner Arbeit auszusprechen.

Außerdem danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. H. Rabes für seinen mir jederzeit zur Verfügung stehenden Rat.

LEBENS LAUF

Am 22. April 1940 wurde ich in Seitendorf/Sudetenland als zweiter Sohn des Volksschullehrers Alfred Kuhn und seiner Ehefrau Margarete geboren. Mein Vater fiel im Krieg. Seit dem Vertreibungsjahr 1946 wohne ich in Germering bei München. Nach fünfjährigem Besuch der Volksschule und neunjährigem Besuch des humanistischen Karls-Gymnasiums in München begann ich im Wintersemester 1960/61 mit dem Medizinstudium an der Universität München. Nach fünf Semestern bestand ich hier das Physikum. Anschließend studierte ich an der Universität Wien und der Medizinischen Akademie Düsseldorf. Dann kehrte ich wieder nach München zurück, wo ich im Mai 1964 mit der Bearbeitung meines Promotionsthemas begann. Am 9. August 1966 bestand ich hier das Staatsexamen. Im September 1966 heiratete ich die Musikstudentin Verónica Lenz. Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent beschäftigt.

